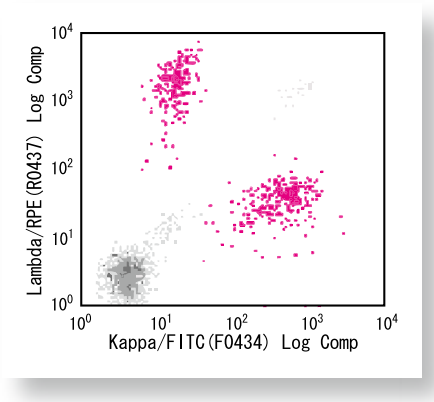
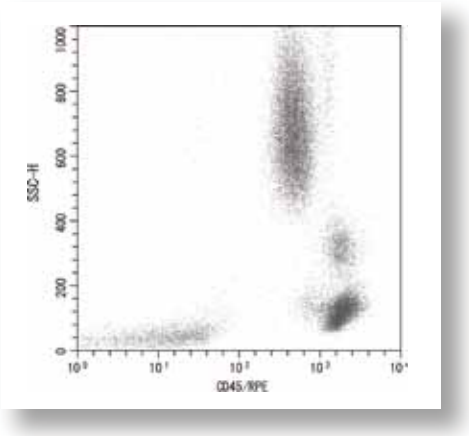
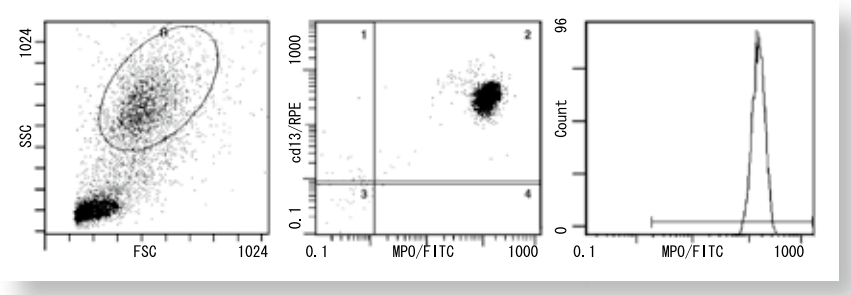
FLOW CYTOMETRY

Staining Protocol | フローサイトメトリー法におけるサンプル調製と染色方法







ヤマサ醤油株式会社

「Staining Protocol フローサイトメトリー法におけるサンプル調製と染色方法」につきまして

本冊子は 2007 年にダコ・ジャパン株式会社によって発行されたものを元に、ヤマサ醤油株式会社にて作成したものです。

参照されるに当たり、下記の点についてご注意ください。

1　2009 年 7 月よりダコ社フローサイトメトリー製品はヤマサ醤油株式会社が販売しております。ダコ社製品コードは継承されておりますので、ご発注の際はダコ社製品コードをそのままご利用ください。

2. 本文中の製品名称とヤマサ醤油登録名称が異なる場合があります。 詳しくは「ダコ フローサイトメトリー用製品カタログ」をご参照ください。

3　フローサイトメトリー製品以外のダコ社製品は、ヤマサ醤油では取り扱いしておりません。

4. 購入方法等につきましては下記ヤマサ醤油株式会社診断薬部までご連絡ください。

＜ダコ社フローサイトメトリー製品に関する問い合せ先＞

ヤマサ醤油株式会社　診断薬部

〒 103-0014
東京都中央区日本橋蛎殻町 1 丁目 23 番 8 号
TEL ; 03(3668)8558　FAX ; 03(3668)8407
URL:http://www.yamasa.com/shindan/index.htm

INDEX

1. 細胞表面抗原の検出

細胞浮遊液の調製方法と 1 種類の蛍光標識特異抗体を用いた場合（直接法）の基本な染色方法を、細胞浮遊液の種類別に BASIC -1- から BASIC -7- に説明しています。

	操作手順	
全血／骨髄	BASIC -1-	P.4
単核細胞（末梢血／骨髄からの分離）	BASIC -2-	P.5
血小板	BASIC -3-	P.6
赤血球	BASIC -4-	P.7
培養細胞	BASIC -5-	P.8
腹水／胸水	BASIC -6-	P.9
リンパ組織／リンパ腫	BASIC -7-	P.10

未標識特異抗体と蛍光標識二次抗体を用いる場合（間接法）や 2 種以上の蛍光標識抗体を用いる場合（多重染色）は、BASIC の染色方法に書かれている「抗原抗体反応による染色 STAINING -1-」を STAINING -2- から STAINING -4- の手順に変更して染色を行ってください。

	操作手順	
間接法（未標識特異抗体と蛍光標識二次抗体を用いる場合）	STAINING -2-	P.11
多重染色 1（2 種類以上の蛍光標識抗体を用いる場合）	STAINING -3-	P.11
多重染色 2（蛍光標識抗体と間接法の組み合わせで染色する場合）	STAINING -4-	P.12

2. IntraStain を用いた細胞質内抗原の検出

2-1. 細胞内 MPO, CD3, CD22, CD79a, TdT, bcl-2, 免疫グロブリンの検出 P.13
2-2. 細胞質内サイトカインの検出 P.14-15

3. 特別なプロトコールを必要とする抗原の検出

3-1. B 細胞における表面免疫グロブリンの検出 P.16-17
3-2. 活性化血小板の検出（抗ヒト CD62P 抗体を用いた染色） P.18

4. 増殖マーカー／癌遺伝子産物／アポトーシスの検出

4-1. IntraStain を用いた Ki-67 (MIB-1) と細胞表面抗原の同時染色 P.19
4-2. 核内抗原と DNA の二重染色 P.20
4-2. BrdU と DNA との二重染色 P.21

＜補助試薬の調製方法＞ P.22

略語一覧

㊎：体外診断用医薬品。体外診断用医薬品名につきましては、「ダコ　フローサイトメトリー用製品カタログ」を参照ください。

劇：医薬用外劇物

1. 細胞表面抗原の検出

BASIC -1-　細胞表面抗原の検出　－全血／骨髄の場合－

試薬の準備

- 細胞表面抗原に対する標識抗体（FITC, RPE, RPE-Cy5, APC 標識など）
- 上記抗体と同一免疫動物で同一サブクラスの標識陰性コントロール試薬
- 溶血試薬: EasyLyse (Code No. S2364) を蒸留水または脱イオン水で 20 倍希釈します。
（＊他の市販の溶血剤を用いる場合は、その取扱説明書等に従ってください。）
- 0.01mol/L PBS (pH7.4) →調製方法は P.22 を参照してください。

染色方法

1. 検体の調製
10×10^6 個 /mL の細胞を含む細胞浮遊液（全血／骨髄）を 100μL ずつ試験管に分注します。

2. 抗原抗体反応による染色
＜Staining -1->
1) 目的の細胞表面抗原に対する標識抗体及びそれと同一サブクラスの標識陰性コントロールを各々の試験管に 10μL ずつ加え、ボルテックスで軽く混和します。
2) 2-8℃の暗所にて 30 分間、または 20-25℃の暗所にて 15 分間反応させます。

＊未標識の特異抗体と蛍光標識二次抗体を用い、間接法で染色する場合→ Staining -2- (P.11)
2 種類以上の蛍光標識抗体を用い、多重染色する場合→ Staining -3- (P.11)
蛍光標識抗体と間接法の組み合わせで、多重染色する場合→ Staining -4- (P.12)

3. 赤血球溶血処理（他の市販の溶血剤を用いる場合は、その取扱説明書等に従ってください）
1) 20 倍希釈した EasyLyse 溶血試薬を 2mL 加え軽く混和し、20-25℃の暗所で 10 分間（溶液の濁りが消えるまで※）反応させます。
2) 遠心分離（20-25℃, 300×g, 5 分間）し、ペレットを含む液量が概ね 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
※溶血が不十分な場合は再度 1), 2) を繰り返してください。

4. 洗浄および浮遊液の調製
1) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を 2mL 加え、よく混和します。
2) 遠心分離（20-25℃, 300×g, 5 分間）し、ペレットを含む液量が概ね 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
3) 1), 2) の操作をもう一度繰り返します。
4) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加え、細胞を再浮遊させます。

＊「Escapee 現象」がみられる検体では、溶血後の洗浄を省略した「No Wash 法」の方がリンパ球の凝集が少ないことが確認されています。

5. フローサイトメーターによる解析

BASIC -2-　細胞表面抗原の検出　－単核細胞（末梢血／骨髄より分離）の場合－

試薬の準備

- 細胞表面抗原に対する標識抗体（FITC, RPE, RPE-Cy5, APC 標識など）
- 上記抗体と同一免疫動物で同一サブクラスの標識陰性コントロール試薬
- 単核球分離液：ヤマサ醤油ではお取扱しておりません。市販品をご利用ください。
- 0.01mol/L PBS (pH7.4) →調製方法は P.22 を参照してください。

染色方法

1. 検体の調製　－比重遠心分離法－

＊　基本的な操作方法を下記に示します。用いる単核球分離液によって、遠心分離の条件など多少操作方法が異なりますので、使用する製品の取扱説明書等に従って操作してください。

1) 遠沈管に全血（抗凝固剤を含む）を 4mL とり、ほぼ同量の 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加え、転倒混和します。
2) 別の遠沈管に単核球分離液 (Ficoll-Hypaque) を 4mL とり、その上に 1) で希釈した血液を重層します。
3) 遠心分離（20℃または 4℃, 400×g, 30 分間）し、分離液と血漿の間の層をピペットで試験管に分取します。
（遠心分離の条件は使用する単核球分離液によって異なります。）
4) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加えよく混和し、遠心分離（2-8℃, 400×g, 8 分間）します。
5) ペレットを含む液量が概ね 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
6) 再度 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加えよく混和し、遠心分離（2-8℃, 400×g, 4 分間）します。
7) ペレットを含む液量が概ね 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
8) 再度 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加えよく混和し、遠心分離（2-8℃, 400×g, 3 分間）します。
9) ペレットを含む液量が概ね 50μL 以下になるように上清を取り除き、0.01 mol/L PBS (pH7.4) を加えて、細胞濃度をおよそ 10×10^6 個 / mL に調整します。
10) 調製した単核細胞浮遊液を 100μL ずつ試験管に分注します。

骨髄性白血病検体など、Fc レセプターを介した非特異反応のおそれがある検体では、正常ヒトγグロブリン分画や正常ヒト AB 型血清、正常マウス IgG などを用いて、Fc レセプターのブロッキングを行ってください。

2. 抗原抗体反応による染色

＜Staining -1->

1) 目的の細胞表面抗原に対する標識抗体及びそれと同一サブクラスの標識陰性コントロールを各々の試験管に 10μL ずつ加え、ボルテックスで軽く混和します。
2) 2-8℃の暗所にて 30 分間、または 20-25℃の暗所にて 15 分間反応させます。

＊未標識の特異抗体と蛍光標識二次抗体を用い、間接法で染色する場合→ Staining -2- (P.11)
2 種類以上の蛍光標識抗体を用い、多重染色する場合→ Staining -3- (P.11)
蛍光標識抗体と間接法の組み合わせで、多重染色する場合→ Staining -4- (P.12)

3. 洗浄および浮遊液の調製

1) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を 2mL 加え、よく混和します。
2) 遠心分離（20-25℃, 300×g, 5 分間）し、ペレットを含む液量が概ね 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
3) 1), 2) の操作をもう一度繰り返します。
4) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加え、細胞を再浮遊させます。

4. フローサイトメーターによる解析

BASIC -3-　細胞表面抗原の検出　ー血小板の場合ー

※活性化血小板の検出方法については、p.18 を参照してください。

試薬の準備

- 血小板関連抗原に対する標識抗体(FITC, RPE, RPE-Cy5, APC 標識など)
- 上記抗体と同一免疫動物で同一サブクラスの標識陰性コントロール試薬
- ACD (acid-citrate-dextrose)→調製方法は P.22 を参照してください。
- 洗浄液:0.01mol/L PBS+0.02mol/L EDTA (pH7.4)→調製方法は P.22 を参照してください。
- 0.01mol/L PBS (pH7.4) →調製方法は P.22 を参照してください。

染色方法

1. 検体の調製(洗浄血小板浮遊液調製法の例を示します。)
   1) 5mL の全血に ACD を 1mL 加え混和します。
   2) 遠心分離(20-25℃, 200×g, 10 分間)し、上清の 2/3 を PRP (platelet-rich plasma) として回収します。
   3) PRP に ACD を加え、pH6.5 になるように調整します。
   4) 遠心分離(20-25℃, 1500×g, 10 分間)し、上清を取り除きます
   5) 洗浄液を加え、遠心分離(20-25℃, 1500×g, 10 分間)し、上清を取り除きます。
      (この操作は 2 回繰り返してください。)
   6) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加え、遠心分離(20-25℃, 1500×g, 10 分間)し、上清を取り除きます。
      (この操作は 2 回繰り返してください。)
   7) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加えて、細胞濃度をおよそ 10×10^6 個 /mL に調整後、100μL ずつ試験管に分注します。

2. 抗原抗体反応による染色

<Staining -1->

1) 目的の細胞表面抗原に対する標識抗体及びそれと同一サブクラスの標識陰性コントロールを各々の試験管に 10μL ずつ加え、軽く混和します。
2) 2-8℃の暗所にて 30 分間、または 20-25℃の暗所にて 15 分間反応させます。

＊未標識の特異抗体と蛍光標識二次抗体を用い、間接法で染色する場合→ Staining -2- (P.11)
2 種類以上の蛍光標識抗体を用い、多重染色する場合→ Staining -3- (P.11)
蛍光標識抗体と間接法の組み合わせで、多重染色する場合→ Staining -4- (P.12)

3. 洗浄および浮遊液の調製
   1) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を 2mL 加え、よく混和します。
   2) 遠心分離(20-25℃, 1500×g, 5 分間)し、ペレットを含む液量が概ね 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
   3) 1), 2) の操作をもう一度繰り返します。
   4) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加え、細胞を再浮遊させます。

4. フローサイトメーターによる解析

BASIC -4-　細胞表面抗原の検出　－赤血球の場合－

試薬の準備

- 細胞表面抗原に対する標識抗体(FITC, RPE, RPE-Cy5, APC 標識など)
- 上記抗体と同一免疫動物で同一サブクラスの標識陰性コントロール試薬
- 0.01mol/L PBS (pH7.4) →調製方法は P.22 を参照してください。

染色方法

1. 検体の調製(洗浄赤血球浮遊液調製法の例を示します)
   1) 遠沈管に全血(抗凝固剤を含む)をとり、遠心分離(20-25℃, 300×g, 5 分間)し、上清(血漿成分)と buffy coat(白血球分画)を除去します。
   2) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加え、十分に混和します。
   3) 遠心分離(20-25℃, 300×g, 5 分間)し、上清を取り除きます。
   4) 2), 3) の操作をもう一度繰り返します。
   5) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加えて、細胞濃度をおよそ 10×10^6 個 /mL に調整します。
   6) 調製した細胞浮遊液を 100μL ずつ試験管に分注します。

2. 抗原抗体反応による染色

<Staining -1->

   1) 目的の細胞表面抗原に対する標識抗体及びそれと同一サブクラスの標識陰性コントロールを各々の試験管に 10μL ずつ加え、軽く混和します。
   2) 2-8℃の暗所にて 30 分間、または 20-25℃の暗所にて 15 分間反応させます。

＊未標識の特異抗体と蛍光標識二次抗体を用い、間接法で染色する場合→ Staining -2- (P.11)
2 種類以上の蛍光標識抗体を用い、多重染色する場合→ Staining -3- (P.11)
蛍光標識抗体と間接法の組み合わせで、多重染色する場合→ Staining -4- (P.12)

3. 洗浄および浮遊液の調製
   1) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を 2mL 加え、よく混和します。
   2) 遠心分離(20-25℃, 300×g, 5 分間)し、ペレットを含む液量が概ね 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
   3) 1), 2) の操作をもう一度繰り返します。
   4) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加え、細胞を再浮遊させます。

4. フローサイトメーターによる解析

BASIC −5−　細胞表面抗原の検出　−培養細胞の場合−

試薬の準備

- 細胞表面抗原に対する標識抗体（FITC, RPE, RPE−Cy5, APC 標識など）
- 上記抗体と同一免疫動物で同一サブクラスの標識陰性コントロール試薬
- 0.01mol/L PBS (pH7.4) →調製方法は P.22 を参照してください。

染色方法

1. 検体の調製
   ＊　培養細胞の場合、基本的に単一種の細胞であるため分離の必要はありません。細胞が凝集している場合はピペッティングやメッシュ濾過等により細胞を分散させてください。
   1）試験管に培養細胞浮遊液をとります。
   2）遠心分離（20−25℃, 300×g, 5 分間）し、上清を取り除きます。
   3）0.01mol/L PBS (pH7.4) を加え、よく混和します。
   4）遠心分離（20−25℃, 300×g, 5 分間）し、上清を取り除きます。
   5）3), 4) の操作をもう一度繰り返します。
   6）上清を取り除き、0.01mol/L PBS (pH7.4) を加えて、細胞濃度をおよそ 10×10^6 個 /mL に調整します。
   7）調製した細胞浮遊液を 100μL ずつ試験管に分注します。

骨髄系細胞株など、Fc レセプターを介した非特異反応のおそれがある検体では、正常ヒトγグロブリン分画や正常ヒト AB 型血清、正常マウス IgG などを用いて、Fc レセプターのブロッキングを行ってください。

2. 抗原抗体反応による染色

＜Staining −1−＞

1）目的の細胞表面抗原に対する標識抗体及びそれと同一サブクラスの標識陰性コントロールを各々の試験管に 10μL ずつ加え、軽く混和します。
2）2−8℃の暗所にて 30 分間、または 20−25℃の暗所にて 15 分間反応させます。

＊未標識の特異抗体と蛍光標識二次抗体を用い、間接法で染色する場合→ Staining −2− (P.11)
2 種類以上の蛍光標識抗体を用い、多重染色する場合→ Staining −3− (P.11)
蛍光標識抗体と間接法の組み合わせで、多重染色する場合→ Staining −4− (P.12)

3. 洗浄および浮遊液の調製
   1）0.01mol/L PBS (pH7.4) を 2mL 加え、よく混和します。
   2）遠心分離（20−25℃, 300×g, 5 分間）し、ペレットを含む液量が概ね 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
   3）1), 2) の操作をもう一度繰り返します。
   4）0.01mol/L PBS (pH7.4) を加え、細胞を再浮遊させます。

4. フローサイトメーターによる解析

BASIC -6-　細胞表面抗原の検出　－腹水／胸水の場合－

試薬の準備

- 細胞表面抗原に対する標識抗体（FITC, RPE, RPE-Cy5, APC 標識など）
- 上記抗体と同一免疫動物で同一サブクラスの標識陰性コントロール試薬
- 溶血試薬（検体に赤血球の混入が認められる場合にのみ必要となります）
  :EasyLyse (Code No. S2364) を蒸留水または脱イオン水で 20 倍希釈します。
  （＊他の市販の溶血剤を用いる場合は、その取扱説明書等に従ってください。）
- 0.01mol/L PBS (pH7.4) →調製方法は P.22 を参照してください。

染色方法

1. 検体の調製
＊検体採取に際しては、凝固を防ぐため抗凝固剤を少量添加して採取します。細胞が凝集している場合は、ピペッティングやメッシュ濾過等により細胞を分散させてください。
   1) 試験管に腹水または胸水をとります。
   2) 遠心分離（20-25℃, 300×g, 5 分間）し、上清を取り除きます。
   3) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加え、よく混和します。
   4) 遠心分離（20-25℃, 300×g, 5 分間）し、上清を取り除きます。
   5) 3), 4) の操作をもう一度繰り返します。
   6) 上清を取り除き、0.01mol/L PBS (pH7.4) を加えて、細胞濃度をおよそ 10×10^6 個 /mL に調整します。
   7) 調製した細胞浮遊液を 100μL ずつ試験管に分注します。
   （検体に赤血球が混入している場合は、抗原抗体反応による染色のあとに溶血処理をしてください。）

2. 抗原抗体反応による染色
<Staining -1->
   1) 目的の細胞表面抗原に対する標識抗体及びそれと同一サブクラスの標識陰性コントロールを各々の試験管に 10μL ずつ加え、軽く混和します。
   2) 2-8℃の暗所にて 30 分間、または 20-25℃の暗所にて 15 分間反応させます。

＊未標識の特異抗体と蛍光標識二次抗体を用い、間接法で染色する場合→ Staining -2- (P.11)
2 種類以上の蛍光標識抗体を用い、多重染色する場合→ Staining -3- (P.11)
蛍光標識抗体と間接法の組み合わせで、多重染色する場合→ Staining -4- (P.12)

3. 赤血球溶血処理（＊検体に赤血球の混入が認められる場合にのみ必要となります。）
   1) 溶血試薬を 2mL 加え軽く混和し、20-25℃の暗所で 10 分間（溶液の濁りが消えるまで）反応させます。
   2) 遠心分離（20-25℃, 300×g, 5 分間）し、ペレットを含む液量が概ね 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
   （＊市販の溶血剤を用いる場合は、その取扱説明書等に従ってください。）

4. 洗浄および浮遊液の調製
   1) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を 2mL 加え、よく混和します。
   2) 遠心分離（20-25℃, 300×g, 5 分間）し、ペレットを含む液量が概ね 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
   3) 1), 2) の操作をもう一度繰り返します。
   4) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加え、細胞を再浮遊します。

5. フローサイトメーターによる解析

BASIC -7-　細胞表面抗原の検出　ーリンパ組織／リンパ腫の場合ー

メディマシーンを用いた細胞浮遊液の調製

Medimachine System は、組織サンプルを半自動的に粉砕する検体処理システムで、迅速かつ容易に細胞浮遊液を調製することが可能です。Medimachine System は、アズワン株式会社より販売されています（ヤマサ醤油ではお取扱しておりません）。

試薬等の準備

- 細胞表面抗原に対する蛍光標識抗体
- 陰性コントロール試薬: 同じアイソタイプ、蛍光標識の陰性コントロール抗体
- メディマシーン（アズワン株式会社）：ヤマサ醤油ではお取扱しておりません。
- メディコン S 50μm（アズワン株式会社）：ヤマサ醤油ではお取扱しておりません。
- フィルコン 50μm シリンジ用またはカップタイプ（アズワン株式会社）：ヤマサ醤油ではお取扱しておりません。
- 0.01mol/L PBS (pH7.4) →予め 2-8℃に冷却しておきます。　→調製方法は P.22 を参照してください。
- 固定液：1% Paraformaldehyde / 0.01mol/L PBS (pH7.4)　→調製方法は P.22 を参照してください。

染色方法

1. 検体の調製
   1) 未固定の新鮮組織を 3mm 角にカットします。
   2) メディマシーンの取扱説明書に従って、メディコンに冷 0.01mol/L PBS (pH7.4) を 1mL 充填し、組織塊を数個程度入れます。
   3) メディマシーンの取扱説明書に従って、メディコンをメディマシーンにセットして、30～60 秒間作動させます。
   4) メディコンを取り出し、シリンジを用いて細胞浮遊液を回収します。組織が無くなるまで、2)～4) の操作を繰り返します。
      さらに冷 0.01mol/L PBS (pH7.4) を 1mL 注入し、残っている細胞を回収します。
   5) 回収した細胞浮遊液をフィルコンで濾過し、濾液を 300×g、5 分間遠心分離して、上清を取り除きます。
   6) 冷 0.01mol/L PBS (pH7.4) を 2mL 加えて、ゆるやかに混和し、300×g、5 分間遠心分離します。
   7) 冷 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加えて、細胞数を 10×10^6 個/mLに調整します。

2. 抗原抗体反応による染色
   1) 試験管に検体を 100μL ずつ分注します。
   2) 蛍光標識抗体、または蛍光標識陰性コントロールをそれぞれ 10μL ずつ添加し、ゆるやかに撹拌します。
   3) 2-8℃の暗所で 30 分間反応させます。

＊未標識の特異抗体と蛍光標識二次抗体を用い、間接法で染色する場合→ Staining -2- (P.11)
2 種類以上の蛍光標識抗体を用い、多重染色する場合→ Staining -3- (P.11)
蛍光標識抗体と間接法の組み合わせで、多重染色する場合→ Staining -4- (P.12)

3. 浮遊液の調製
   1) 冷 0.01mol/L PBS (pH7.4) を 2mL 加えて、よく混和します。
   2) 遠心分離（20-25℃, 300×g, 5 分間）し、ペレットを含む液量が 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
   3) 1), 2) の操作をもう一度繰り返します。
   4) 適量の 1% Paraformaldehyde /0.01mol/L PBS (pH7.4) を加えて、細胞を再浮遊させます。

4. フローサイトメーターによる解析

Staining -2- 間接法 ―未標識特異抗体と蛍光標識二次抗体を用いる場合―

＜未標識特異抗体の反応＞

1) 目的の細胞表面抗原に対する精製抗体Ⓐ*1 とそれと同一サブクラスの未標識陰性コントロールⒶを各々の試験管に 10μL 加え、軽く混和します。
2) 2-8℃の暗所にて 30 分間、または 20-25℃の暗所にて 15 分間反応させます。

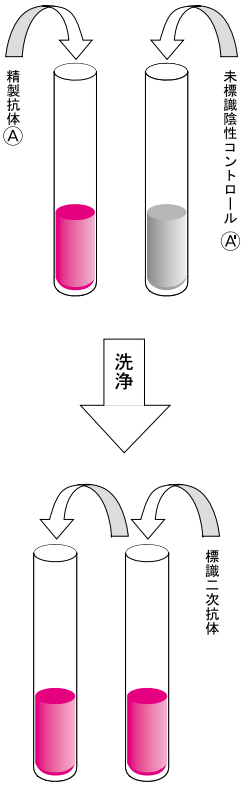
＜洗浄＞

3) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加え、よく混和します。
4) 遠心分離(条件は、検体の種類によって異なります)し、ペレットを含む液量が概ね 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
5) 3), 4) の操作をもう一度繰り返します。

＜蛍光標識二次抗体の反応＞

6) 蛍光標識二次抗体 *2 を各々の試験管に 10μL ずつ加え、よく混和します。
7) 2-8℃の暗所にて 30 分間、または 20-25℃の暗所にて 15 分間反応させます。

*1 : 至適濃度が不明の場合は、希釈倍率の検討を行ってください。
*2 : 弊社製品につきましては、下記の希釈倍率を目安に、製品ロット毎に確認の上でご使用ください。



	蛍光物質	Code No.	参考希釈倍率
Anti-Mouse Immunoglobulin, F(ab')2	FITC	F0479	1:10-20
Goat Polyclonal antibodies	RPE	R0480	1:10-20
Anti-Mouse Immunoglobulin, F(ab')2	FITC	F0313	1:10-20
Rabbit Polyclonal antibodies	RPE	R0439	1:10-20
Anti-Rabbit Immunoglobulin, F(ab')2	FITC	F0054	1:10-20
Swine Polyclonal antibodies			

Staining -3- 多重染色 1 ―2 種類以上の蛍光標識抗体を用いる場合―

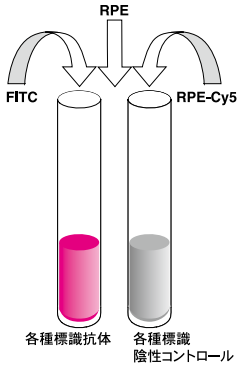
＜蛍光標識抗体の反応＞

1) 目的の細胞表面抗原に対する 2 種または 3 種の異なる標識抗体を試験管に各 10μL ずつ加え、別の試験管にそれと同一サブクラスの各標識陰性コントロールを 10μL ずつ加えて、軽く混和します。
2) 2-8℃の暗所にて 30 分間、または 20-25℃の暗所にて 15 分間反応させます。

◇多重染色における注意点◇

多重染色の場合、抗原の量、抗体の種類またはその組み合わせによって、至適抗体濃度の検討が必要となる場合があります。また異なる標識抗体を同時に反応させることにより、いずれかの標識抗体の反応性が悪くなることもありますので、単染色での結果と多重染色での結果を比較し、確認されることをお薦めします。単染色との結果が異なる場合は、それぞれの標識抗体を 1 つずつ反応させることにより解決することがあります。この場合、各々の標識抗体の反応の後に、以下の洗浄操作を行ってください。

1) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を 2mL 加え、よく混和します。
2) 遠心分離(条件は検体の種類によって異なります)し、ペレットを含む液量が概ね 50μL 以下になるように上清を取り除きます。



Staining -4- 多重染色 2 ―蛍光標識抗体と間接法の組み合わせで染色する場合―

＜未標識特異抗体の反応＞

1) 目的の細胞表面抗原に対する精製抗体Ⓐとそれと同一サブクラスの未標識陰性コントロールⒶを各々の試験管に 10μL 加え、軽く混和します。
2) 2-8℃の暗所にて 30 分間、または 20-25℃の暗所にて 15 分間反応させます。

＜洗浄＞

3) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を 2mL 加え、よく混和します。
4) 遠心分離(20-25℃, 300×g, 5 分間)し、ペレットを含む液量が概ね 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
5) 3), 4) の操作をもう一度繰り返します。

＜蛍光標識二次抗体の反応＞

6) 蛍光標識二次抗体 *1 を各々の試験管に 10μL 加え、よく混和します。
7) 2-8℃の暗所にて 30 分間、または 20-25℃の暗所にて 15 分間反応させます。

＜洗浄＞

8) 3), 4) の操作を 2 回繰り返します。

＜ブロッキング＞

9) 各試験管に 1) で用いた未標識特異抗体と同じ動物の正常血清(例えばマウスモノクローナル抗体を 1) で使用した場合は正常マウス血清 (Code No. X0910:ヤマサ醤油ではお取扱しておりません))を 50μL(細胞浮遊液と等量)加えて混和し、20-25℃の暗所にて 15 分間反応させます。

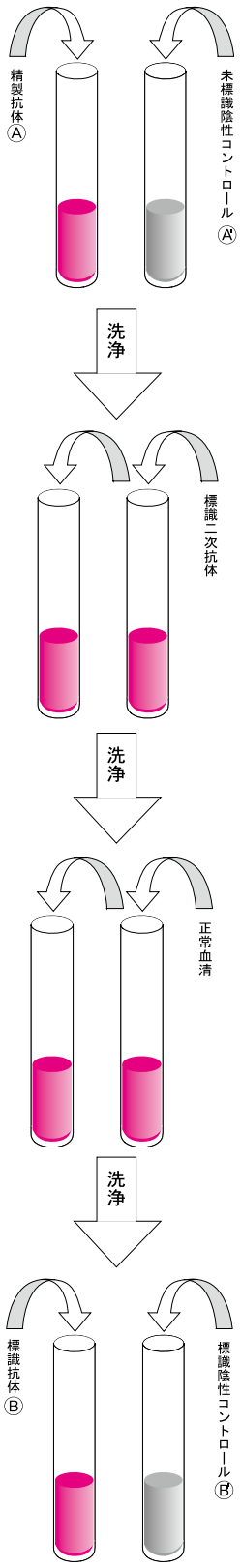
＜洗浄＞

10) 3), 4) の操作を 1 回繰り返します。

＜蛍光標識抗体の反応＞

11) 目的の細胞表面抗原に対する標識抗体Ⓑとそれと同一サブクラスの標識陰性コントロールⒷを各々の試験管に 10μL ずつ加え、よく混和します。
12) 2-8℃の暗所にて 30 分間、または 20-25℃の暗所にて 15 分間反応させます。

*1 : 至適濃度が不明の場合は、希釈倍率の検討を行ってください。
(弊社製品につきましては、P.11 に記載されている希釈倍率を目安に、製品ロット毎に確認の上でご使用ください。)



2-1. IntraStain を用いた細胞質内抗原の検出

―細胞内 MPO・CD3・CD22・CD79a・TdT・bcl-2・免疫グロブリンの検出―

試薬の準備

- 細胞質内抗原に対する標識抗体
- 細胞表面抗原に対する標識抗体
  （＊細胞質内抗原のみ染色の場合は必要ありません。）
- 上記抗体と同一免疫動物で同一サブクラスの標識陰性コントロール試薬
- IntraStain (Code No. 劇 K2311)

  [試薬の構成]

  Reagent A : 固定液 (劇) 10mL

  Reagent B : 膜透過処理液 10mL
- 0.01mol/L PBS (pH7.4) →調製方法は P.22 を参照してください。

Anti Human	FITC	RPE	陰性コントロール
MPO	F0714	R7209	X0927 または X0928
CD3	(医) F0818	(医) R0810	X0927 または X0928
CD22	F7060	R7061	X0927 または X0928
CD79a		R7159	X0928
TdT	F7139		X0927
bcl-2	F7053		X0927
IgG	F0185		X0929
IgA	F0188		X0929
IgM	F0058		X0929
IgD	F0189		X0929
Kappa※	F0434	R0436	X0929 または X0930
Lambda※	F0435	R0437	X0929 または X0930

※印の抗体は、P.16 の希釈倍率を参考に希釈をしてご使用ください。

染色方法

1. 検体の調製

   10^6 個の細胞を含む細胞浮遊液(全血／骨髄／培養細胞など)を 50μL ずつ試験管に分注します。

2. 細胞表面抗原の染色(＊細胞質内抗原のみ染色の場合はこのステップを飛ばしてください。)
   1) 目的の細胞表面抗原に対する標識抗体とそれと同一サブクラスの標識陰性コントロールを各々の試験管に加え、よく混和します。
   2) 20-25℃の暗所にて 15 分間反応させます。

3. 固定操作
   1) 各試験管に IntraStain Reagent A(固定液)を 100μL ずつ加え、ボルテックスでゆるやかに混和します。
   2) 20-25℃の暗所にて 15 分間反応させます。

4. 洗浄
   1) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を 2mL 加え、十分に混和します。
   2) 遠心分離(20-25℃, 300×g, 5 分間)、ペレットを含む液量が概ね 50μL 以下になるように上清を取り除き、ボルテックスでペレットをよくほぐします。

5. 膜透過処理及び細胞質内抗原の染色
   1) 各試験管に IntraStain Reagent B(膜透過処理液)を 100μL ずつ加え、さらに目的の細胞質内抗原に対する標識抗体または同一サブクラスの標識陰性コントロールを加えて、ボルテックスでゆるやかに混和します。
   2) 20-25℃の暗所にて 15 分間反応させます。

6. 洗浄および浮遊液の調製
   1) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を 2mL 加え、よく混和します。
   2) 遠心分離(20-25℃, 300×g, 5 分間)し、ペレットを含む液量が概ね 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
   3) 1), 2) の操作をもう一度繰り返します。
   4) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加え、細胞を再浮遊させます。

細胞質内抗原に対する標識抗体
一般に細胞質内抗原の検出に用いる抗体は、標識物質として、分子量の小さい FITC 標識抗体を用いることが推奨されています。その他の標識物質であっても、CD79a のように RPE 標識抗体でも検出が可能な抗原もありますので、ご確認のうえご使用ください。

7. フローサイトメーターによる解析

解析上の注意点
通常の細胞表面抗原のみの測定とは異なり、固定された細胞では自家蛍光が強くなります。陰性コントロールを併用し、陰性領域の確認を行ってください。

2-2. IntraStain を用いた細胞質内抗原の検出 ―細胞質内サイトカインの検出―

細胞質内サイトカインの検出では、大きく分けて下記の 2 つのステップがあります。

Step 1) 細胞の活性化と調製
細胞を活性化し、サイトカインの産生を促す。一定時間刺激した後、産生したサイトカインが細胞外へ放出するのをブロックし、細胞質内に貯蓄させる。

一般的によく用いられている PMA と ionomycin を用いて、細胞を刺激します。またサイトカインが細胞外への放出されるのをブロックするために、細胞質内においてゴルジ体からのタンパク質輸送をブロックする薬剤である brefeldin A(または monensin)を用い、細胞質内にサイトカインを蓄積させます。

Step 2) 標識抗体を用いた染色
細胞質内のサイトカインを染色するために、細胞膜に膜透過処理を施し、標識された抗サイトカイン抗体を用いて染色する。

このステップは通常の細胞質内抗原の染色法と原則的に同じですが、培養した細胞を用いるため、バックグランドが高くなることが考えられます。洗浄に用いるバッファーには BSA を含んだ PBS を用いることをお奨めします。また FCM による解析時には、必ず陰性コントロールを併用し、陰性領域の確認を行ってください。

試薬の準備

Step 1) 細胞の活性化と調製
下記製品はいずれもヤマサ醤油ではお取扱しておりません。市販品をご利用ください。

- PMA
- ionomycin
- brefeldin A
- monensin

Step 2) 標識抗体を用いた染色

- サイトカインに対する標識抗体(フローサイトメトリー用の抗体をご使用ください。)
- 細胞表面抗原に対する標識抗体
- 上記抗体と同一免疫動物で同一サブクラスの標識陰性コントロール試薬
- IntraStain (Code No. 劇 K2311)

[試薬の構成]

Reagent A :	固定液 (劇)	10mL
Reagent B :	膜透過処理液	10mL

- 0.01mol/L PBS (pH7.4)→調製方法は P.22 を参照してください。
- 0.5% BSA 加 0.01mol/L PBS (pH7.4)

染色方法

Step1　細胞の活性化と調製

1. 細胞の調製
細胞数が 1×10^6 個/mL になるように、細胞を培養液に浮遊させます。

2. 細胞の活性化
上記の培養液に PMA や ionomycin など細胞を刺激する薬剤を至適濃度になるように加え、37℃で一定時間インキュベートします。
刺激に用いられる薬剤の種類・濃度そして反応時間は、目的のサイトカインによって異なります。
注）細胞の活性化には Ca^{2+} イオンが必要ですので、血液を検体とする場合、抗凝固剤にはヘパリンをご使用ください。

3. サイトカインの細胞外放出をブロックさせる。
インキュベート終了の 2～4 時間前に、培養液中に至適濃度に調整した brefeldin A または monensin を添加します。インキュベート終了後、培養容器を氷中におき、さらに冷 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加えて反応を止めます。

4. 検体の調製及び洗浄
1) 細胞浮遊液を 50μL ずつ試験管に分注します。
2) 冷 0.01mol/L PBS (pH7.4)を加え、よく混和します。
3) 遠心分離(20-25℃, 300×g, 5 分間)し、ペレットを含む液量が概ね 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
4) 2), 3) の操作をもう一度繰り返します。
5) 0.5% BSA 加 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加え、10×10^6 個 /mL になるように調整し、100μL ずつ試験管に分注します。

Step2　標識抗体を用いた染色

1. 細胞表面抗原の染色
目的の細胞表面抗原に対する標識抗体及びそれと同一サブクラスの標識陰性コントロールを各々の試験管に加え、20-25℃の暗所にて 15 分間反応させます。

2. 固定操作
1) 各試験管に IntraStain Reagent A(固定液)を 100μL ずつ加え、ボルテックスでゆるやかに混和します。
2) 20-25℃の暗所にて 15 分間反応させます。

3. 洗浄
1) 0.5% BSA 加 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加え、よく混和します。
2) 遠心分離(20-25℃, 300×g, 5 分間)、ペレットを含む液量が概ね 50μL 以下になるように上清を取り除きます。

4. 膜透過処理及び細胞質内抗原の染色
1) 各試験管に IntraStain Reagent B(膜透過処理液)を 100μL ずつ加え、さらに目的の細胞内抗原に対する標識抗体または同一サブクラスの標識陰性コントロールを加えて、ボルテックスでゆるやかに混和します。
2) 20-25℃の暗所にて 15 分間反応させます。

5. 洗浄および浮遊液の調製
1) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を 2mL 加え、よく混和します。
2) 遠心分離(20-25℃, 300×g, 5 分間)し、ペレットを含む液量が概ね 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
3) 1), 2) の操作をもう一度繰り返します。
4) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加え、細胞を再浮遊させます。

6. フローサイトメーターによる解析

解析上の注意点
通常の細胞表面抗原のみの測定とは異なり、固定された細胞では自家蛍光が強くなります。
陰性コントロールを併用し、陰性領域の確認を行ってください。

3-1. B 細胞における免疫グロブリンの検出 ―細胞表面免疫グロブリン―

血漿成分には免疫グロブリンが多量に含まれており、この遊離免疫グロブリンが Fc レセプターを介して細胞表面に結合したり、荷電的に付着していることがあります。全血検体でそのまま細胞表面免疫グロブリンを染色すると、染色に用いた抗ヒト Ig 抗体が血漿中の遊離免疫グロブリンに消費されてしまうため、目的とする B 細胞表面上の抗原に十分に結合できず、偽陰性となることがあります。また、血漿中の免疫グロブリンが細胞に結合／付着し(細胞付着免疫グロブリン)、しばしば非特異反応の大きな原因となります。

このため細胞表面免疫グロブリンの染色では、下記の項目が重要です。

1. 血漿中の遊離免疫グロブリン及び細胞に結合／付着している免疫グロブリンを洗浄除去
2. 他動物種(できれば染色に用いる標識抗体と同一種)の免疫グロブリンによるブロッキング(使用する蛍光標識抗体も Fc レセプターに結合したり、荷電的に付着する可能性があるため)
3. 使用する標識抗体の至適濃度の検討(抗体濃度が濃すぎると、余分な抗体が非特異反応を起こしやすい)

ここでは、表面免疫グロブリン検出のための前処理方法、標識抗体の参考希釈率等を含めた染色方法を紹介します。また、非特異反応の影響を最小限にするため、表面免疫グロブリン検出には CD19 と組み合わせた 2 カラー分析または 3 カラー分析をお勧めします。

試薬の準備

IgG, IgA, IgM, IgD の検出の場合

- 抗ヒト IgG (γ 鎖) 抗体, F(ab')$_2$／FITC 標識 (Code No. F0185)
- 抗ヒト IgA (α 鎖) 抗体, F(ab')$_2$／FITC 標識 (Code No. F0188)
- 抗ヒト IgM (μ 鎖) 抗体, F(ab')$_2$／FITC 標識 (Code No. F0058)
- 抗ヒト IgD (δ 鎖) 抗体, F(ab')$_2$／FITC 標識 (Code No. F0189)
- ウサギ 正常 Ig, F(ab')$_2$／FITC 標識 (Code No. X0929) : 陰性コントロール試薬
- 抗ヒト CD19, HD37 抗体／RPE 標識 (Code No. ㊮ R0808) : 体外診断用医薬品
- マウス IgG1／RPE 標識 (Code No. X0928) : 陰性コントロール試薬

Kappa Light Chain & Lambda Light Chain 検出用の抗体試薬(2 カラー分析の場合)

- 抗ヒト L 鎖 κ 抗体, F(ab')$_2$／FITC 標識 (Code No. F0434) 参考希釈率 1〜10 倍
- 抗ヒト L 鎖 λ 抗体, F(ab')$_2$／FITC 標識 (Code No. F0435) 参考希釈率 1〜10 倍
- ウサギ 正常 Ig, F(ab')$_2$／FITC 標識 (Code No. X0929) : 陰性コントロール試薬
- 抗ヒト CD19, HD37 抗体／RPE 標識 (Code No. ㊮ R0808) : 体外診断用医薬品
- マウス IgG1／RPE 標識 (Code No. X0928) : 陰性コントロール試薬

Kappa Light Chain & Lambda Light Chain 検出用の抗体試薬(3 カラー分析の場合)

- 抗ヒト L 鎖 κ ／FITC + L 鎖 λ ／RPE デュアルカラー抗体 (Code No.㊮ FR481) : 体外診断用医薬品
- ウサギ 正常 Ig, F(ab')$_2$／FITC 標識 + ウサギ 正常 Ig, F(ab')$_2$／RPE 標識 デュアルカラー陰性コントロール (Code No. X0935) : 陰性コントロール試薬
- 抗ヒト CD19, HD37 抗体／RPE-Cy5 標識 (Code No. C7066) または APC 標識 (Code No. C7224) : ご使用のフローサイトメーターの機種によって蛍光色素を選択してください。
- マウス IgG1／RPE-Cy5 標識 (Code No. X0955) または APC 標識 (Code No. X0968) : 陰性コントロール試薬

その他に必要な試薬

- ウサギ 正常 Ig／未標識 (Code No. X0903) : ブロッキング試薬として使用(ヤマサ醤油ではお取扱しておりません)。
- 溶血試薬 : EasyLyse (Code No. S2364) を蒸留水または脱イオン水で 20 倍希釈します。
- 0.01mol/L PBS (pH7.4) →調製方法は P.22 を参照してください。
- 0.5% BSA 加 0.01mol/L PBS (pH7.4) : 0.01mol/L PBS (pH7.4) に BSA を 0.5%になるように溶解します。

FITC 標識抗ヒト Ig 抗体、FITC 標識抗ヒト L 鎖 κ 抗体は上記の希釈率を参考に、0.01mol/L PBS (pH7.4) で希釈してください(推奨希釈率は製品のロットにより異なりますので、製品添付のスペックシートを参照してください)。
陰性対象として、陰性コントロール試薬を標識抗体と同濃度に 0.01mol/L PBS (pH7.4) で希釈します。試験管 1 本(全血 100μL)に使用する試薬量は各 10μL です。

染色方法

1. 検体の調製

＜血漿中および細胞表面付着イムノグロブリンの除去＞

1) 10×10^6 個 /mL の細胞を含む細胞浮遊液(全血／骨髄)を 100μL ずつ試験管に分注します。
2) 0.5% BSA 加 0.01mol/L PBS (pH7.4) を 2 mL ずつ加え、ボルテックスで軽く混和します。
3) 300×gで 5 分間遠心分離し、約 100μL 残して上清を吸引除去します。
4) 操作 2) 及び 3) の操作を 2 回繰り返します。

＜ブロッキング＞

5) ウサギ正常イムノグロブリン分画を 10μL ずつ加え、ボルテックスで混和します。
6) 20-25℃で 30 分間インキュベーションします。
7) 0.5% BSA 加 0.01mol/L PBS (pH7.4) を 2 mL ずつ加え、ボルテックスでよく混和します。
8) 300×gで 5 分間遠心分離し、約100μL 残して上清を吸引除去します。

2. 抗原抗体反応による染色

1) 各蛍光標識抗ヒト免疫グロブリン抗体(希釈調製済み)、抗ヒト CD19 抗体(原液)、標識陰性コントロールをそれぞれの試験管に 10μL 加えて、ボルテックスでゆるやかに混和します。

陰性対照として、通常の陰性コントロールの他に、蛍光標識ウサギ 正常 Ig, $F(ab')_2$ 陰性コントロール試薬と蛍光標識 CD19 抗体の組み合わせも用意してください。

2) 2-8℃の暗所にて 30 分間反応させます。

3. 赤血球溶血処理(他の市販溶血剤を用いる場合は、その取扱説明書等に従ってください。)

1) 20 倍希釈した EasyLyse 溶血試薬を 2mL 加えて軽く混和し、20-25℃の暗所で 10-15 分間(溶液の濁りが消えるまで)反応させます。
2) 遠心分離(20-25℃, 300×g, 5 分間)し、ペレットを含む液量が 50μL 以下になるように上清を取り除きます。

4. 洗浄および浮遊液の調製

1) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加え、よく混和します。
2) 遠心分離(20-25℃, 300×g, 5 分間)し、ペレットを含む液量が 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
3) 1), 2) の操作をもう一度繰り返します。
4) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を加え、細胞を再浮遊します。

5. フローサイトメーターによる解析

解析上の注意点

通常の散乱光サイトグラム(FSC／SSC ドットプロット)によるゲーティングに加えて、CD19／SSC または CD19／FSC のドットプロット上でも CD19 陽性細胞をゲーティングすることにより、B 細胞のみをゲーティングでき、他の細胞集団の混入による非特異反応の影響を最小限にできます。

細胞付着免疫グロブリンの影響が著しい場合、細胞集団全体のバックグラウンド蛍光が強まり、陰性コントロール試薬で設定したカーソルでの陽性率測定が難しい場合がありますので、CD19 との 2 カラー・ドットプロットで、細胞集団の分布パターンを確認してください。また、測定機器の蛍光コンペンセーション不良と混同しないように注意してください。

L 鎖 κ／ L 鎖 λ／CD19 の 3 カラー分析の場合、L 鎖 κ／L 鎖 λ の 2 カラー・ドットプロット上で、左下から右上の対角線上に分布するダブルポジティブ集団は、通常は非特異反応であると考えられます。

3-2. 活性化血小板の検出(抗ヒト CD62P 抗体を用いた染色)

検体の採取

抗凝固剤にクエン酸ナトリウムを用いて採血した静脈血

採血後の検体放置によって血小板の CD62P 発現が変動する恐れがあるため、採血後 1 時間以内に染色を開始することが推奨されています。また、EDTA を用いて採血した検体では、血小板の CD62P 発現が高まることがあります。

試薬等の準備

- 抗ヒト CD62P, P−Selectin 抗体: RPE 標識が一般的です(ダコ社製品で該当する製品はありません。市販品をご利用ください)。
- 陰性コントロール試薬: CD62P と同じアイソタイプ、標識のコントロール抗体
- 血小板ゲーティング用試薬: 抗ヒト CD41, gpIIb/IIIa 抗体/FITC 標識 (Code No. F7088) または 抗ヒト CD61, gpIIIa 抗体/FITC 標識 (Code No. F0803) または APC 標識 (Code No. C7280)
- 0.01mol/L PBS(pH7.4) →調製方法は P.22 を参照してください。
- 固定液:1% Paraformaldehyde / 0.01mol/L PBS (pH7.4) →調製方法は P.22 を参照してください。
- 15mm×75mm 試験管(ポリプロピレン製またはシリコン処理ガラス製を推奨)

染色方法

1. 検体の調製

クエン酸ナトリウム採血した全血を 100μL とり、PBS で 8 倍〜20 倍に希釈します。
(血小板数 1×10^7 個/mL 前後を目安に希釈してください。)

血小板刺激物質を用いて in vitro で血小板を活性化させる場合は、別の試験管に希釈した全血を 1mL 取り、至適濃度に調整した刺激物質を添加して、予め予備検討により定めた条件で反応させてください。

2. 抗原抗体反応による染色

1) 2 本の試験管に検体を 100μL ずつ分注します。
2) 片方の試験管に抗ヒト CD62P 抗体/RPE 標識を、もう片方の試験管に陰性コントロール/RPE 標識をそれぞれ 10μL ずつ添加し、弱く撹拌します。
3) 全ての試験管に抗ヒト CD41 抗体/FITC 標識または抗ヒト CD61 抗体/FITC 標識を 10μL 加えて、弱く撹拌します。
4) 20-25℃の暗所で 15 分間反応させます。

3. 浮遊液の調製

赤血球の溶血処理や遠心分離が CD62P 陽性の血小板数に影響を及ぼす恐れがあるため、未溶血・未洗浄法による分析が推奨されています。

1) 試験管に 1%パラホルムアルデヒド加 PBS を 120μL ずつ添加します。
2) 試験管に PBS を 1mL ずつ加えて、弱く撹拌します。

4. フローサイトメーターによる解析

解析上の注意点
・前方散乱 (FSC)、側方散乱 (SSC)、蛍光 (FL1、FL2) は、いずれもログスケールを使用し、ログ FL1(FITC 蛍光)にスレッショルドを設定します。
・FITC 蛍光 (CD41 または CD61) とログ前方散乱 (Log FSC) のドットプロットで、血小板(CD41 または CD61 陽性かつ低 FSC)にゲートを設定します。
・血小板ゲート内イベントについて、RPE 蛍光と前方散乱または FITC 蛍光のドットプロット上で血小板の CD62P 陽性率を求めます。

＜参考＞固定洗浄血小板浮遊液(全血検体を用いない場合)の検体調製方法の例

1) 抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムまたは ACD を含む全血 2mL に等量の 2% Paraformaldehyde / 0.01mol/L PBS (pH 7.4) を静かに加え、緩やかに混和します。

注:In vitro で血小板を活性化する場合は、血小板刺激物質を反応させた後に検体を固定してください。

2) 2-8℃で 60 分間固定します。
3) 遠心分離(20-25℃, 200×g, 10 分間)し、上清の 3 分の 2 を回収します。
4) 適量の 0.01mol/L PBS (pH 7.4) を加えて、遠心分離(20-25℃, 1500×g, 10 分間)し、上清を取り除きます。
5) 0.01mol/L PBS (pH 7.4) で血小板数 1×10^7 個 /mL に調整し、試験管に 100μL 分注します。

4-1. IntraStain を用いた Ki-67 (MIB-1) と細胞表面抗原の同時染色

IntraStain を核内抗原の染色に応用する場合、界面活性剤や冷メタノール追固定等による膜透過処理の増強が必要です。ここでは Nonidet P-40 (NP-40) を用いた変法を紹介します。最適な固定・膜透過処理方法は、対象となる抗原や用いる抗体により異なりますので、抗体試薬の添付取扱説明書に従ってください。

試薬の準備

- Ki-67 (MIB-1) 抗体／FITC 標識 (Code No. F7268)
- マウス IgG1／FITC 標識 (Code No. X0927):陰性コントロール試薬
- 細胞表面抗原に対する蛍光標識抗体:RPE 標識、APC 標識など
- IntraStain (Code No. 劇 K2311)

  [試薬の構成]

  Reagent A:固定液 (劇) 10mL, Reagent B : 膜透過処理液 10mL
- 膜透過処理液:IntraStain Reagent B 液 1mL に対して Nonidet P-40 (NP-40) を 1μL の割合で溶解します。
- 0.01mol/L PBS (pH7.4) →調製方法は P.20 を参照してください。
- 固定液:1% Paraformaldehyde/0.01mol/L PBS (pH7.4)→調製方法は P.22 を参照してください。

染色方法

1. 検体の調製

   検体(全血または細胞浮遊液)を 1～2×10^6 個の細胞を含むように試験管に分注します。

   固形腫瘍の場合は、メディマシーン等を用いて単離細胞を得ます(10 ページ参照)。培養細胞の場合は、細胞回収後に 0.01mol/L PBS (pH7.4) で 2 回洗浄します。

2. 細胞表面抗原の染色(細胞内染色のみの場合は省略可能です。)
   1) 至適濃度に調製した細胞表面抗原に対する蛍光標識抗体を各々の試験管に加えて、よく混和します。
   2) 20-25℃の暗所にて 15 分間(または 2-8℃の暗所にて 30 分間)反応させます。
   3) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を 2mL 加えて、よく混和します。
   4) 遠心分離(20-25℃, 300×g, 5 分間)して、ペレットを含む液量が 50μL 以下 になるように上清を取り除きます。

3. 固定
   1) 各試験管に IntraStain Reagent A(固定液)を 細胞 1×10^6 個に対し 50μL の割合で加えて、ボルテックスでゆるやかに混和します。
   2) 20-25℃の暗所にて 10 分間反応させます。
   3) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を 2mL 加えて、よく混和します。
   4) 遠心分離(20-25℃, 300×g, 5 分間)し、ペレットを含む液量が 50μL 以下になるように上清を取り除きます。

4. 膜透過処理及び細胞質内抗原の染色
   1) ボルテックスで十分に撹拌した後、各試験管に 膜透過処理液(IntraStain Reagent B 液 1mL に対して Nonidet P-40 (NP-40) を 1μL の割合で溶解)を細胞 1×10^6 個に対し 50μL の割合で加えて、ボルテックスでゆるやかに混和します。
   2) Ki-67 (MIB-1) 抗体／FITC 標識、またはマウス IgG1 陰性コントロール試薬／FITC 標識をそれぞれ細胞 1×10^6 個に対し 10μL 加えて、ボルテックスでゆるやかに混和します。
   3) 2-8℃の暗所にて 15 分間反応させます。
   4) 0.01mol/L PBS (pH7.4) を 2mL 加えて、よく混和します。
   5) 遠心分離(20-25℃, 300×g, 5 分間)し、ペレットを含む液量が 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
   6) 1), 2) の操作をもう一度繰り返します。
   7) 適量の 1% Paraformaldehyde/0.01mol/L PBS (pH7.4) を加えて、細胞を再浮遊します。

5. フローサイトメーターによる解析

解析上の注意点

核内抗原の染色では、陰性コントロール抗体で設定したカーソル位置が陽性率の算定に適さない場合があります。染色上に問題がないことを確認するため、適切な陰性コントロール検体、陽性コントロール検体を同時に分析することをお奨めします。

DNA 染色を組み合わせたマルチカラー分析を行う場合、RPE 標識抗体との組み合わせでは DRAQ5、APC 標識抗体との組み合わせでは Propidium Iodide を使用してください。

4-2. 核内抗原と DNA の二重染色

Ki-67 や PCNA などの核内抗原と細胞周期の同時解析のための染色方法の一例を示します。最適な固定・膜透過処理方法は、対象となる抗原の種類や用いる抗体により異なりますので、抗体試薬の添付取扱説明書に従ってください。

試薬の準備

- 核内抗原に対するモノクローナル抗体: FITC 標識を推奨
  ＊下記の抗体希釈液で 至適濃度に希釈したものを抗体反応液とします。
- 陰性コントロール試薬:同じアイソタイプ、蛍光標識の陰性コントロール抗体
  ＊下記の抗体希釈液で FITC 標識抗体反応液と同じ濃度に希釈したものを反応液とします。
- 0.01mol/L PBS (pH7.4) →調製方法は P.22 を参照してください。
- 70%エタノール溶液: あらかじめ -20℃に冷却しておきます。
- 洗浄バッファー:0.01mol/L PBS (pH7.4) に BSA を 1%になるように溶解します。
- 抗体希釈液:0.01mol/L PBS (pH7.4) に BSA を0.5%、Tween-20 を 0.5%になるように溶解します。
- RNase 溶液:Ribonuclease-Aを上記 Wash Bufferに 0.2mg/mL になるように溶解します。
- PI 染色液:Propidium Iodideを上記 Wash Buffer に 20μg/mL になるように溶解します。
  ＊Ribonuclease-A、Propidium Iodideはヤマサ醤油ではお取扱いしておりません。市販品をご利用下さい。

染色方法

1. 検体の調製
   固形腫瘍の場合は、メディマシーン等を用いて単離細胞を得ます(10 ページ参照)。末梢血や骨髄の場合は、比重遠心分離法を用いて単核球を分離します(5 ページ参照)。
   1) 2×10^6 個 /mL の細胞浮遊液 1mL を遠沈管に分注し、ボルテックスでよく撹拌します。
   2) -20℃に冷却した 70%エタノール溶液 5mL をボルテックスで撹拌しながら、ゆっくりと滴下します。
   3) 10 分毎にボルテックスで撹拌しながら、20-25℃で 30 分間放置して細胞を固定します。
   4) 2 本の試験管に固定した細胞浮遊液を 3mL ずつ分注します。
   5) 遠心分離(20-25℃, 300×g, 5 分間)し、ペレットを含む液量が 100μL 程度になるように、アスピレーターで上清を取り除きます。
   6) 洗浄バッファーを 2mL 加え、よく混和します。
   7) 遠心分離(20-25℃, 300×g, 5 分間)し、ペレットを含む液量が 50μL 以下になるように、アスピレーターで上清を取り除きます。
   8) 6), 7) の操作をもう一度繰り返します。

2. 抗原抗体反応による染色および PI 染色
   1) FITC 標識抗体反応液、または陰性コントロール反応液をそれぞれ 200μL 加え、2-8℃の暗所で 30 分～60 分間反応させます。
      (反応温度と時間は、抗体試薬の添付取扱説明書に従ってください。)
   2) 洗浄バッファーを 2mL 加え、十分に混和します。
   3) 遠心分離(20-25℃, 300×g, 5 分間)し、上清を取り除きます。
   4) RNase 溶液を 100μL を加え、十分に混和します。
   5) さらに、ペレットに PI 染色液を 1mL 加え、20-25℃の暗所で 15 分間反応させます。

3. フローサイトメーターによる解析

   解析上の注意点

   核内抗原の染色では、陰性コントロール抗体で設定したカーソル位置が陽性率の算定に適さない場合があります。染色上に問題がないことを確認するため、適切な陰性コントロール検体、陽性コントロール検体を同時に分析することをお奨めします。

4-3. BrdU と DNA との二重染色

ブロモデオキシウリジン (BrdU) は細胞中には存在しませんので、あらかじめ BrdU を取り込ませた細胞が分析対象となります。
(例:最終濃度 10μmol/L の BrdU を含む培養液中で 37℃、30 分培養)

試薬の準備

- 抗ブロモデオキシウリジン (BrdU) 抗体／FITC 標識 (Code No. F7210)
- マウス IgG1／FITC 標識 (Code No. X0927):陰性コントロール試薬
- 正常ヤギ血清 (Code No. X0907):ブロッキング試薬(ヤマサ醤油ではお取扱しておりません)。
- 0.01mol/L PBS (pH 7.4):調製方法は P.22 を参照してください。
- 1% BSA 加 0.01mol/L PBS (pH 7.4):0.01mol/L PBS (pH7.4) に BSA を 1%になるように溶解します。
- 洗浄バッファー:0.01 mol/L PBS に BSA を 1%、Tween-20 を 0.5%になるように溶解し、2-8℃に冷却しておきます。
- 70%エタノール溶液:あらかじめ -20℃に冷却しておきます。
- DNA 処理液:2 mol/L 塩酸(蒸留水 50 mL に対し濃塩酸 10 mL の割合で加えます)に Triton X-100 を 0.5%になるように溶解します。
- 中和液(0.1 mol/L 硼砂溶液 (pH8.5)):硼砂(四ホウ酸ナトリウム, $Na_2B_4O_7$)を蒸留水 100 mL に対し 2.012g の割合で溶解します。
- PI 染色液:Propidium Iodide(ヤマサ醤油ではお取扱いしておりません。市販品をご利用下さい。)を上記 Wash Buffer に 5μg/mL になるように溶解します。

染色方法

1. 検体の調製

＜固定＞

1) BrdU 処理した細胞を回収し、1% BSA 加 0.01mol/L PBS (pH 7.4) で 2 回洗浄します。
2) 0.01mol/L PBS (pH 7.4)で 10×10^6 個 /mL に調整した細胞浮遊液 1mL を遠沈管に分注し、ボルテックスでよく撹拌して、氷中に置きます。
3) -20℃に冷却した 70%エタノール溶液 5mL をボルテックスで撹拌しながら、ゆっくりと滴下します。
4) 10 分毎に撹拌しながら、氷中で 30 分間放置して細胞を固定します。
5) 遠心分離(500×g, 10 分間)した後、ペレットを含む液量が 50μL 以下になるようにアスピレーターで上清を取り除き、ボルテックスで十分に撹拌してペレットをほぐします。

＜DNA 変性処理＞

9) DNA 処理液 1 mL をボルテックスで撹拌しながらゆっくりと加え、20-25℃で 30 分間反応させます *1。
10) 遠心分離(500×g, 10 分間)し、ペレットを含む液量が 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
11) ペレットに中和液を 3 mL 加え、ボルテックスで十分に混和します *2。
12) 遠心分離(500×g, 10 分間)し、ペレットを含む液量が 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
13) 11)、12) の操作をもう一度繰り返します。
12) 洗浄バッファーを 3 mL 加え、よく混和します。
13) 遠心分離(500×g, 10 分間)し、ペレットを含む液量が 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
14) 洗浄バッファーで細胞数が 10×10^6個 /mL になるように調整し、試験管に 100μL ずつ分注します。

注 : *1 塩酸処理によって DNA が部分的に解離状態になり、後の PI 染色性に影響します。BudU と PI の染色性は原理的に相反します。強い塩酸処理では BrdU の染色性が良い反面、PI の染色性は劣ります。弱い処理では逆のことが言えます。DNA 量測定に支障の無い範囲での強い処理が最良の条件であり、蛍光強度のばらつきを最小限にするため、常に一定の条件で処理を行ってください。
*2 試験管壁に残留した塩酸によって pHの低下を来たし、後の抗体反応に影響することがありますので、最終的に pH 試験紙で確認することをお勧めします。

2. 抗原抗体反応による染色および PI 染色

1) 試験管に正常ヤギ血清を 10μL ずつ加え、20-25℃で 10 分間ブロッキングします。
2) FITC 標識抗 BrdU 抗体とマウス IgG1／FITC 標識陰性コントロールを各々の試験管に 10μL ずつ加え、2-8℃の暗所で 30 分間反応させます。
3) 洗浄バッファーを 3 mL 加え、よく混和します。
4) 遠心分離(500×g, 10 分間)し、ペレットを含む液量が 50μL 以下になるように上清を取り除きます。
5) PI 溶液を 1mL 加え、よく混和します。

3. フローサイトメーターによる解析

解析上の注意点

染色上に問題がないことを確認するため、適切な陰性コントロール検体、陽性コントロール検体を同時に分析することをお勧めします。

補助試薬の調製方法

試薬 1) 0.01mol/L PBS (pH7.4)

a) 10 倍濃縮液の調製
NaCl 80.0g, KH_2PO_4 2.0g, $Na_2HO_4 : 2H_2O$, 14.4g, KCl 2.0g を蒸留水で溶解し、pH7.4 に調整します。さらに蒸留水を加えて全量を 1L にします。保存は密閉して冷暗所にて保存してください。

b) 1 倍液の調製
上記 10 倍濃縮液を蒸留水で 10 倍に希釈して使用します。

試薬 2) 0.01mol/L PBS + 0.02mol/L EDTA (pH7.4)

a) 10 倍濃縮液の調製
NaCl 80.0g, KH_2PO_4 2.0g, $Na_2HO_4 : 2H_2O$, 14.4g, KCl 2.0g, EDTA・2Na 74.5g を蒸留水で溶解し、pH7.4 に調整します。
さらに蒸留水を加えて全量を 1L にします。保存は密閉して冷暗所にて保存してください。

b) 1 倍液の調製
上記 10 倍濃縮液を蒸留水で 10 倍に希釈して使用します。

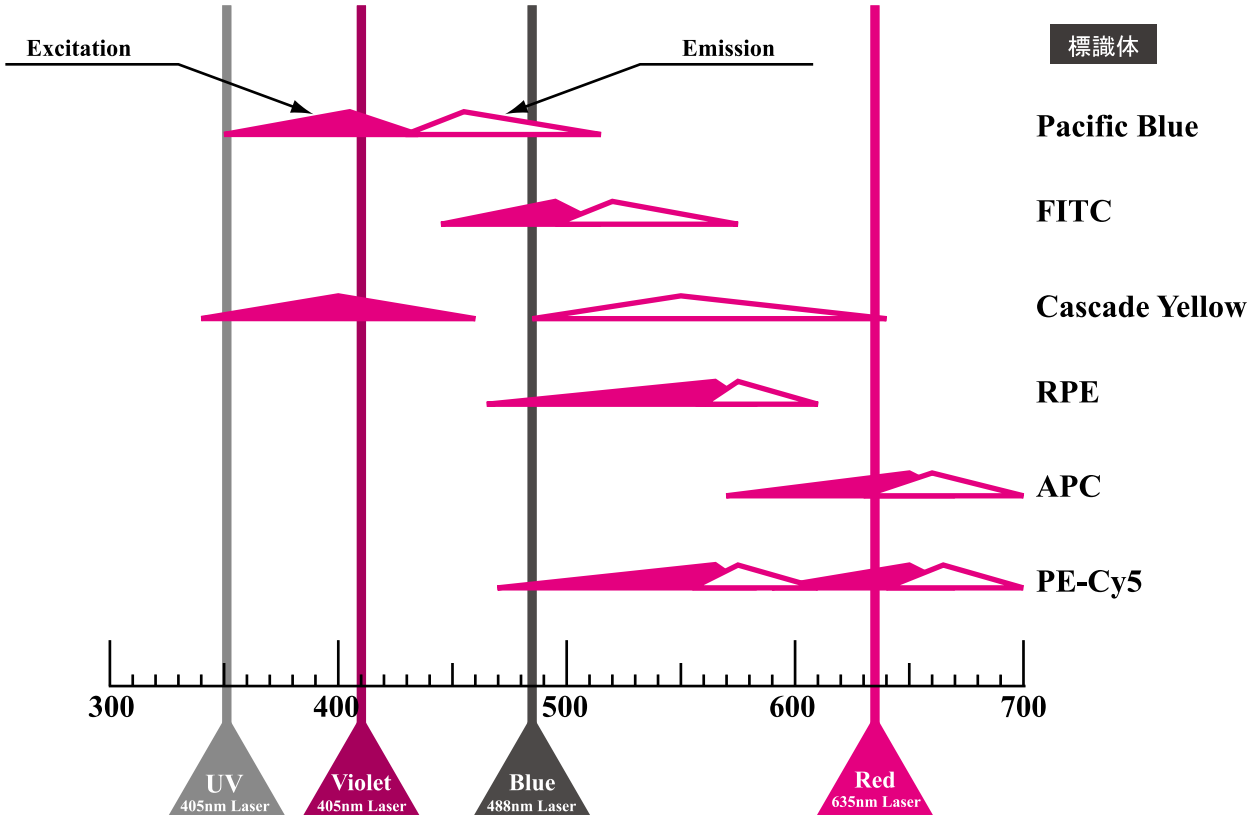
試薬 3) ACD (acid-citrate-dextrose)

クエン酸 7.3g, クエン酸ナトリウム 2 水和物 22.0g, グルコース 24.5g を蒸留水で溶解し、全量 1L にします。

試薬 4) 1%Paraformaldehyde/ 0.01mol/L PBS (pH7.4)

密栓できる容器に Paraformaldehyde 1.0g と 80mL の蒸留水を加え、65℃温浴にて溶解させ、保温しながら 5mol/L NaOH を少量加えます。
パラホルムアルデヒドを完全に溶かしたのち、0.1mol/L PBS (pH7.4) を 10mL 加え、冷却後 1mol/L HCl で pH7.4 に調整します。
さらに蒸留水を加えて全量を 100mL にします。保存は密閉して冷暗所にて保存してください。(約 3 週間安定)

※使用する緩衝液は全て 0.22μm のフィルターで濾過してください。



Fluorochrome Guide

製造販売元

ダコ・ジャパン株式会社

〒112-0004
京都文京区後楽 2-5-1
住友不動産飯田橋ファーストビル
TEL;03(5802)7211
FAX;03(5802)7212
URL:http://www.dako.jp

販売元

ヤマサ醤油株式会社
診断薬部

〒103-0014
東京都中央区日本橋蛎殻町 1 丁目 23 番 8 号
TEL;03(3668)8558
FAX;03(3668)8497
URL:http://www.yamasa.com/shindan/index.htm